

PRODUCCIÓN DE PROTEASAS ASPÁRTICAS DE *ASPERGILLUS NIGER* POR FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO Y SU APLICACIÓN EN HIDROLIZADOS DE PROTEÍNA DE QUINUA

Ruggieri, Germán; Spelzini, Darío.

Área Físicoquímica
Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas UNR

Área: Ciencias Biológicas

Sub-Área: Biotecnología

Grupo: Y

Palabras clave: proteasas, hidrolizados, quinua.

INTRODUCCIÓN

Aspergillus niger es un hongo filamentoso que crece aeróbicamente sobre materia orgánica, y es uno de los microorganismos más utilizados en la industria biotecnológica. Muchas de las enzimas producidas por este microorganismo fueron catalogadas por la FDA como GRAS (del inglés “generally regarded as safe”), es decir, que son consideradas no patogénicas o no tóxicas (Schuster y col., 2002). Entre estas enzimas se encuentran las proteasas.

Las proteasas del género *Aspergillus* se producen tanto en fermentaciones sumergidas como en estado sólido (FES), siendo éste último caso el que presenta los mayores rendimientos (Sandhya y col., 2005). La FES es un proceso de fermentación llevado a cabo sobre un material no-soluble (sustrato) que actúa como soporte físico y medio de nutrientes en ausencia de líquido de flujo libre (Pandey, 1992).

Dentro de las proteasas que produce este hongo, se encuentran las proteasas aspárticas, que se caracterizan por tener pH óptimos bajos (entre 3 y 4) (Siala y col., 2009). Por otra parte, además, produce proteasas neutras o alcalinas (Coral y col., 2003; Abidi y col., 2014), las cuales son generalmente serin-proteasas que se caracterizan por tener pH óptimos altos (entre 7 y 11) y por su estabilidad a altas temperaturas.

La quinua es un alimento que ha ganado una gran importancia en el mundo gracias a sus reportados beneficios nutricionales. Según la literatura, los granos de quinua presentan un contenido medio de proteínas de 12-13% y, según recomendaciones de la FAO y la WHO, suministran niveles adecuados de lisina y metionina (Abugoch y col., 2008).

La hidrólisis de las proteínas alimentarias usando proteasas modifica sus propiedades funcionales como: aumento de la solubilidad (Mannheim y Cheryan, 1992), estabilización de espumas (Martínez y col., 2009) y de emulsiones (Celus y col., 2009), aumento de la estabilidad térmica (Haque y Mozaffar, 1992), entre otras. Además, los hidrolizados proteicos presentan diversas propiedades biológicas, como por ejemplo, actividad antioxidante (Bougatef y col., 2009).

Con todos estos antecedentes, se llevaron a cabo fermentaciones en estado sólido con *A. niger* utilizando materiales de desecho como sustrato no inerte (cáscara de cítricos y cascarilla de soja) con el fin de producir proteasas. Estas enzimas fueron caracterizadas y empleadas para generar hidrolizados de proteína de semillas quinua, los cuales, posteriormente, fueron estudiados en cuanto a sus propiedades funcionales.

OBJETIVOS

- Optimizar y validar la producción de las proteasas con actividad proteolítica sobre proteínas de quinua y obtener extractos fúngicos extracelulares para la producción de hidrolizados.
- Caracterizar las proteasas obtenidas (temperatura y pH óptimos, estabilidad en función del tiempo y pH) y establecer las condiciones óptimas de la reacción de proteólisis (pH, temperatura).
- Analizar distintas propiedades de los hidrolizados (grado de hidrólisis, actividad antioxidante, hidrofobicidad superficial, solubilidad).

METODOLOGÍA

Fermentación en estado sólido

Se utilizó la cepa de *A. niger* NRRL 3. El hongo fue crecido en tubos picos de flauta de agar papa a 30 °C hasta la producción de conidios (5-7 días de incubación). Los sustratos sólidos (SS) no inertes empleados para la fermentación fueron cascarilla de soja y cáscaras de naranja. El medio sólido constó de una mezcla de cáscara de cítricos y cascarilla de soja. El Medio Basal (MB) se preparó con la siguiente composición (P/V): 1% MgSO₄; 1% NaCl; 0,008% FeSO₄. Además, se le administraron distintas cantidades de NaNO₃ (3-5 g/L), de acuerdo al diseño experimental. La fermentación se efectuó colocando en cada placa de Petri 3 g de mezcla de sustratos sólidos y el medio basal estériles. Luego, cada placa fue inoculada con 50000 conidios e incubada en estufa a una temperatura constante de 30 °C durante 8 días. Luego se procedió a extraer las enzimas agregando 10 mL agua sobre el cultivo sólido, agitando 10 minutos y filtrando en papel para obtener el extracto fúngico extracelular (EFE).

Determinación de actividad enzimática

Se obtuvo un aislado de proteínas de quinua (PQ) a partir de harina de quinua según el protocolo de Abugoch y col. (2008) y se liofilizó. Luego, se preparó una solución acuosa de PQ 2,5% P/V y se adicionó HCl 0,3 N en una proporción 1:4 (HCl:PQ) para desnaturalizar a las proteínas; la mezcla se mantuvo en agitación durante 30 minutos a TA. Luego, se ajustó el pH a 7,6. Concentración PQ 2% P/V.

Para medir la actividad proteolítica sobre proteínas de quinua (APQ) se utilizaron 600µL PQ y 100µL EFE, incubando a 37°C durante 15 minutos. Luego, se siguió el protocolo de Cupp-Enyard (2008) determinando Abs 660 nm. Una unidad de actividad enzimática corresponde a un cambio de 0,01 unidades de abs. Para caracterizar la actividad enzimática los EFE fueron incubados a distinta temperatura y pH para determinar los valores óptimos de pH y temperatura y la estabilidad enzimática.

Preparación de hidrolizados de proteínas de quinua

Se mezclaron 10 µL de EFE con 600 µL de aislado de PQ 2% P/V, pH 9,0. La mezcla se incubó a 40 °C a distintos tiempos, entre 0 y 6 horas. Se detuvo la reacción por calentamiento (100 °C, 5 min). A continuación, los tubos fueron centrifugados a 10000 g por 10 minutos, y se utilizó la fase soluble de los hidrolizados de proteína de quinua (HPQ). En cada ensayo descripto a continuación se empleó un triplicado de cada HPQ. El grado de hidrólisis se determinó por el método de Adler-Nielsen (1979).

Determinación de actividad antioxidante

Se basó en el protocolo descripto por Re y col. (1999). Empleando el radical de ABTS*, se procedió a medir la actividad antioxidante utilizando 50 µL de HPQ en 1 mL de reactivo. Se determinó la Abs a 730 nm en función del tiempo, y se tomó la pendiente de la recta inicial como la actividad antioxidante de cada muestra.

Determinación de concentración de péptidos solubles

Se prepararon 2 mL de los HPQ, se llevaron a un pH 4,5 para precipitar las proteínas. Luego, se centrifugó a 10000 g por 10 minutos y se midió la concentración de péptidos solubles mediante el método de Lowry (1951), midiendo Abs 750nm.

RESULTADOS

Optimización de la actividad proteolítica con proteínas de quinua

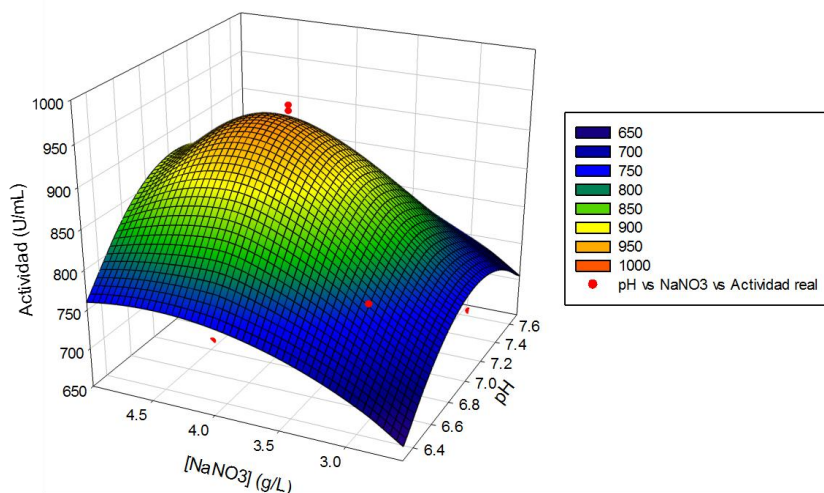


Figura 1: Modelo predictivo de superficie de respuesta de la actividad proteolítica de los EFE sobre una solución de aislado de proteínas de quinua.

En la gráfica se observa que el modelo predice un máximo de actividad para condiciones de pH y concentraciones de NaNO_3 intermedias. Esto quiere decir que llevando a cabo una FES en estas condiciones ($\text{pH} = 7$; $[\text{NaNO}_3] = 4 \text{ g/L}$) se obtendría un máximo de actividad proteolítica de los extractos obtenidos. Este resultado fue validado posteriormente, obteniéndose EFE con valores de actividad entre 900-1000 U/mL.

Caracterización de las proteasas

La actividad proteolítica de los EFE fue mayor a valores de pH de reacción alcalinos, siendo un rango de pH de reacción comprendido entre 9,99 y 12,16 el que permitió obtener la mayor actividad. Asimismo, se determinó que en el rango de pH de 4,05-11,15 las proteasas resultaron estables, mientras que en los extremos más ácidos y alcalinos, la actividad de las mismas resultó menor. Por otra parte, se obtuvo una temperatura óptima de reacción de 65°C , y se observó que las enzimas eran estables en el rango de temperaturas $30\text{-}65^\circ\text{C}$. Por último, se determinó que las proteasas en el EFE son estables a 60°C por hasta 3 hs de incubación, mientras que a 65 y 70°C las enzimas pierden actividad a los 160 y 60 minutos respectivamente.

Propiedades de los hidrolizados

Se determinó la actividad antioxidante de los HPQ (Figura 2), observándose un aumento de la misma con los tiempos de hidrólisis; se obtuvo un pico a las 5 hs de iniciada la reacción. Se observó un aumento de la solubilidad de los HPQ con el tiempo de hidrólisis, siendo el máximo valor el obtenido a las 6 hs ($13,34 \text{ mg/mL}$). El grado de hidrólisis fue del 6 %.

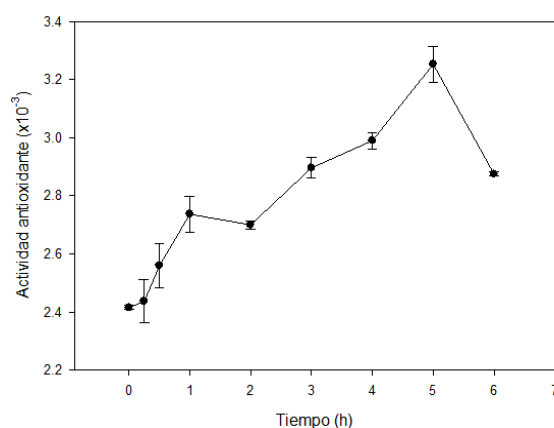


Figura 2: Dependencia de la actividad antioxidante de captura del radical ABTS* con el tiempo de hidrólisis.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Abidi, F., Aissaoui, N., Lazar, S., & Marzouki, M. N.** (2014). Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease from *Aspergillus niger*. Use in Antioxidant peptides production. *J. Mater. Environ. Sci*, 5(5), 1490-1499.
- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., & Rivera, M.** (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) protein isolates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(12), 4745-4750.
- Adler-Nielsen, J.** (1979) Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-1262.
- Bougatef, Ali, Mohamed Hajji, Rafik Balti, ImenLassoued, YosraTriki-Ellouz, and MoncefNasri.** (2009). Antioxidant and Free Radical-Scavenging Activities of Smooth Hound (*Mustelus Mustelus*) Muscle Protein Hydrolysates Obtained by Gastrointestinal Proteases. *Food Chemistry* 114 (4): 1198–1205.doi:10.1016/j.foodchem.2008.10.075.
- Celus, Inge, Kristof Brijs, and Jan A. Delcour.** (2009). Fractionation and Characterization of Brewers' Spent Grain Protein Hydrolysates.*Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (12): 5563–70. doi:10.1021/jf900626j.
- Coral, G., Arikan, B., Unaldi, M. N., & Guvenmez, H.** (2003). Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. *Annals of microbiology*, 53(4), 491-498.
- Cupp-Enyard C.** (2008). Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. *JoVE*. 19. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=899>, doi: 10.3791/899.
- Haque, Z. U., & Mozaffar, Z.** (1992). Casein hydrolysate. II. Functional properties of peptides. *Food Hydrocolloids*, 5(6), 559-571.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
- Mannheim, Adie, and Munir, Cheryan.** (1992). Enzyme-Modified Proteins from Corn Gluten Meal: Preparation and Functional Properties.*Journal of the American Oil Chemists Society* 69 (12): 1163–69.
- Martínez, Karina D., Cecilio Carrera Sánchez, Juan M. Rodríguez Patino, and Ana M. R. Pílosof** (2009). Interfacial and Foaming Properties of Soy Protein and Their Hydrolysates.*Food Hydrocolloids* 23 (8): 2149–57.
- Pandey, A.** (1992). Recent process developments in solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 27(2), 109-117.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.** (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Sandhya, C., Sumantha, A., Szakacs, G., & Pandey, A.** (2005). Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40(8), 2689-2694.
- Schuster, E., Dunn-Coleman, N., Frisvad, J. C., & Van Dijck, P.** (2002). On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(4-5), 426-435.
- Siala, R., Kamoun, A., Hajji, M., Abid, L., Gharsallah, N., & Nasri, M.** (2009). Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization. *African Journal of Biotechnology*, 8(18).